

⑬ Int. Cl.⁵

C 12 Q 1/68
C 07 H 21/00

識別記号

A

庁内整理番号

6807-4B
7822-4C

⑭ 公開 平成3年(1991)4月30日

審査請求 未請求 請求項の数 19 (全18頁)

⑮ 発明の名称 核酸の検出方法

⑯ 特 願 平1-303182

⑰ 出 願 平1(1989)11月24日

優先権主張 ⑱ 平1(1989)6月23日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 平1-159718

㉑ 発 明 者	加 藤 欽 也	東京都大田区下丸子3丁目30番2号	キャノン株式会社内
㉒ 発 明 者	山 本 伸 子	東京都大田区下丸子3丁目30番2号	キャノン株式会社内
㉓ 発 明 者	岩 下 晴 美	東京都大田区下丸子3丁目30番2号	キャノン株式会社内
㉔ 発 明 者	桜 永 昌 徳	東京都大田区下丸子3丁目30番2号	キャノン株式会社内
㉕ 出 願 人	キャノン株式会社	東京都大田区下丸子3丁目30番2号	
㉖ 代 理 人	弁理士 若 林 忠		

明 細 書

1. 発明の名称

核酸の検出方法

2. 特許請求の範囲

1) 試料核酸とプローブ核酸とを反応させ、得られた反応混合物中への被検出核酸・プローブ核酸ハイブリッドの形成の有無を分析する過程を含む核酸の検出方法において、

a) 試料核酸とプローブ核酸とを反応させる過程と、

b) 過程 a で得られた反応混合物中に形成されたハイブリッドのみに標識を施す過程と、

c) 過程 b において標識化されたハイブリッドを該標識を利用して検出する過程と

を含むことを特徴とする核酸の検出方法。

2) プローブ核酸または試料核酸が担体に固定化されている請求項 1 に記載の核酸の検出方法。

3) プローブ核酸のヌクレオチド鎖長が、被検出核酸のヌクレオチド鎖長の 1/10 以下である請求項 1 または 3 のいずれかに記載の核酸の検出方

法。

4) 複数種のプローブ核酸が所定の配置で担体に固定化されている請求項 2 に記載の核酸の検出方法。

5) 複数種の試料核酸が所定の配置で担体に固定化され、過程 a において 1 種のプローブ核酸と反応される請求項 2 に記載の核酸の検出方法。

6) 各プローブ核酸におけるハイブリッド形成反応が同一条件化で進行するのに必要なヌクレオチド鎖長を各プローブ核酸が有する請求項 4 に記載の核酸の検出方法。

7) プローブ核酸のヌクレオチド長が、被検出核酸のヌクレオチド鎖長の平均の 1/10 以下である請求項 4 ~ 6 のいずれかに記載の核酸の検出方法。

8) 被検出核酸が遺伝子病に特有な塩基配列を有する請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の核酸の検出方法。

9) プローブ核酸のヌクレオチド鎖長が、100 塩基以下である請求項 8 に記載の核酸の検出方

法。

10) プローブ核酸が、遺伝子病の点突然変異を検出し得るヌクレオチド鎖長が25塩基以下のオリゴヌクレオチドである請求項8に記載の核酸の検出方法。

11) 被検出核酸とハイブリダイズするプローブ核酸を担体に固定した請求項2に記載の核酸の検出方法に用いる核酸検出用固定化プローブ。

12) 複数種のプローブ核酸が所定の配置で担体に固定化されている請求項11に記載の核酸検出用固定化プローブ。

13) プローブ核酸のヌクレオチド長が、標識化被検出核酸のヌクレオチド鎖長の1/10以下である請求項12に記載の核酸検出用固定化プローブ。

14) 複数種のプローブ核酸を所定の配列で担体に固定した請求項12に記載の核酸検出用固定化プローブ。

15) 各プローブ核酸におけるハイブリッド形成反応が同一条件化で進行するのに必要なヌクレオ

該方法に用いる固定化プローブ及び該方法を利用した遺伝子病に特有な遺伝子の検出方法に関する。

[従来の技術]

一本鎖のDNAやRNAが互いに相補性を有している場合、相補性を有する部分が結合して二本鎖となりハイブリッドを形成する。このハイブリダイゼーション反応を利用した核酸の検出や定量のための方法としてサザン法等の種々の方法があり、遺伝子のクローニング、遺伝子組換え、所望の遺伝子のスクリーニング、あるいは検体遺伝子を用いた疾病の診断等の各種遺伝子工学的手法における基本的技術の一つとなっている。

核酸のハイブリダイゼーションを利用した分析方法としては、DNAやRNAからなるプローブにハイブリッドの検出のための標識を施し、これを試料核酸とハイブリダイズさせ、形成されるハイブリッドをプローブに付与した標識を利用して検出する方法が一般的である。

このプローブの標識化の方法としては、放射性

チド鎖長を各プローブ核酸が有する請求項14に記載の核酸検出用固定化プローブ。

16) 複数種のプローブ核酸のヌクレオチド鎖長が、標識化被検出核酸のヌクレオチド鎖長の平均の1/10以下である請求項14または15に記載の核酸検出用固定化プローブ。

17) 標識化被検出核酸が遺伝子病に特有な塩基配列を有する請求項12～17のいずれかに記載の核酸検出用固定化プローブ。

18) 複数種のプローブ核酸のヌクレオチド鎖長が、100塩基以下である請求項14に記載の核酸検出用固定化プローブ。

19) 複数種のプローブ核酸が、遺伝子病の点突然変異を検出し得るヌクレオチド鎖長が25塩基以下のオリゴヌクレオチドである請求項14に記載の核酸検出用固定化プローブ。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は、相補性を有する2種の核酸によるハイブリッド形成反応を利用した核酸の検出方法、

同位元素をプローブに導入する方法、あるいは発光反応、発色反応、蛍光反応等に必要化合物等をプローブに導入あるいは結合させる方法等が用いられている。

プローブとしては、例えば動物、植物、微生物等から直接分離した核酸断片、所定の基準に従ってクローニングしたクローン化核酸断片、合成機器によって合成したオリゴヌクレオチド等が、分析の目的等に応じて利用されている。

[発明が解決しようとする課題]

遺伝子工学の発展にともない、ハイブリダイゼーションを利用した核酸の分析法の利用頻度や応用範囲も拡大しつつあり、より簡便な操作で感度良い分析が行なえる方法に対する要請が高まっている。

例えば、放射性同位元素を用いた標識化は、ハイブリッドの検出感度が良い等の利点を有する反面、放射性物質を扱うので、そのための高価な試薬、特別な機器、装置等が必要であり、また操作に危険性を伴う。

これに対して、ビオチン-アジピン-抗アジピン抗体-蛍光色素複合体の蛍光反応を利用する酵素による標識化に代表される非放射性標識は、安全かつ簡便な操作により標識化及び検出が行なえ、用いる試薬も安価であるという利点を有するが、プローブの標識に用いた場合に検出感度が低くなり易いという欠点がある。

また、各種分析においては、標識化されるプローブとして100塩基以上のヌクレオチド鎖長を有する核酸断片が用いられる場合が多い。このような比較的長い核酸断片は、その標識化が比較的容易であるという利点を有するが、合成機による合成が困難であり、その調達に生体からの分離操作やクローニング等の煩雑な作業が必要となるという欠点がある。

これに対し、100塩基未満の長さの核酸断片は、合成機器によって容易に合成できるという利点がある。しかしながら、標識化、特にニックトランスレーションや酵素による標識化が容易でないという短所がある。

遺伝子病の診断は、一般的には、遺伝子病に特徴的な酵素の活性やタンパク質の量を測定し、その結果からこれらの欠損や異常があるかどうかを判断することによって行なわれているが、場合によっては疾患の指標となる酵素の存在がサンプリングの困難な臓器等の部分に極在し、検体の入手が困難であったり、また測定すべき指標酵素を特定できないこともあり、これらの診断方法は必ずしも満足できるものではない。

また、ウイルス感染症の診断は、もっぱらELISA法やPA法により行なわれてきたが、これらの方法は必ずしも正確なものではない。

遺伝子病、癌、ウイルス感染を、検体の採取が比較的容易であり、正確な検査が期待できる遺伝子レベルでの診断によって正確に早期発見できれば、適切な治療を早期に行なうことができる。そこで、遺伝子レベルでの診断方法に対する要望が高まっている。

その有力な方法の一つとして、例えばRFLP (restriction fragment length polymorphism)

更に、複数種のプローブを用いて複数種の核酸を同時に分析したい場合に、形成されたハイブリッドにどのプローブが含まれているのかを判別するためには、各核酸に対応するプローブのそれぞれに異なる標識を施す必要がある。しかしながら、このような操作は極めて煩雑である。

一方、疾病と関連する遺伝子の検出方法へのハイブリダイゼーションを利用した核酸の分析法の応用が注目されている。

遺伝子レベルでの変異等によって誘発される疾病として、例えばフェニルケトン尿症、サラセミアなどの遺伝性ヘモグロビン異常症、OTC (ornithine transcarbamylase) 欠損症、Duchenne型筋ジストロフィー等種々の遺伝子病が知られている。

また、ある種の癌の発生に遺伝子変異による蛋白質の変異が関与しているとの報告がある。

あるいは、AIDS、ATL等の重篤な疾患がレトロウイルスによって引き起されている可能性が高まっている。

がある。

この方法は、ヒトの全遺伝子を制限酵素によって切断して得たDNA断片をアガロースゲル電気泳動で展開し、これを放射性同位元素等により標識化したプローブDNAとハイブリダイズさせ、標識を利用して検出されるハイブリッドの電気泳動パターンを、正常遺伝子で同様にして得た電気泳動パターンと比較することによって疾病と関連する遺伝子の存在を検出する方法である。

RFLP等を利用した遺伝子の解析による遺伝子病の診断法は、より確実な診断を行なう上で極めて有用な方法として注目されている。

しかしながら、これらの方法の実施に際しては、試験者に対して分子生物学的知識や熟練した技術が要求され、しかも操作が極めて煩雑であるため、医師、検査技術者等の医療に携わっている者が容易に実施できる方法ではない。

また、これらの方法は、DNAの切断、サザンブロッティング、ハイブリダイゼーションの各工程にそれぞれ1日程度の時間を要し、最終的な結

果を得るまでに長時間を要し、一回の検査に取り換える検体数に限りがあるので、多くの患者のDNAを多項目にわたって検査するのは極めて困難な作業となる。

また、核酸のハイブリダイゼーションを利用した検出方法の細菌等の微生物の分類法、特に病原菌の検定への応用が注目されている。

微生物の分類学的な同定は、その微生物の生態学的性状や生化学的性状を、標準微生物と比較検討することによって行なわれてきた。

ところが、このような方法では、検査法の違いによって性状の判定が異なったり、どの性状に重点をおくかによって同定結果が異なりする場合がある。

検体が感染症を引き起した患者から得た細菌等の場合、その同定結果に誤りがあると、適切な対応処置ができないことになるので、より確実な同定法が特に必要とされる。

そこで、近年、より確実な同定法を提供する目的で、細菌感染症における原因細菌の検出、同定

上記1)の方法として、細菌から抽出したDNAを適当な制限酵素で切断して得たランダムフラグメントをクローン化し、そのなかから目的の分類群とのみ特異的に反応するクローンを選択してプローブとして用いる方法が、例えば、Criale, M. S., Flowers, R. S. et al.; DNA probes, 143-148, 1986等により知られている。

上記2)の方法としては、Edelstein, P. H.; J. Clin. Microbiol., 23:481-484, 1986に開示された方法が知られている。この方法は、細菌のリボゾームRNAが同一分類群内で比較的類似していることに着目した方法であり、細菌の染色体中に多数の遺伝子コピーが存在するので、リボゾームRNAを用いれば検出感度が高くなるという利点がある。

上記3)の方法としては、Proteus 属のリボゾームRNAの塩基配列から選択した、Proteus 属に属する細菌の属、種または亜種等に特異的な塩基配列をプローブに利用した例が(Haun, G. &

にDNA-DNAハイブリダイゼーション法を用いる試みがなされてきている。

この方法は、細菌のDNAのなかで該細菌に特徴的な塩基配列に着目してそれを基準配列とし、該基準配列と相同性の高い塩基配列が検体細菌から抽出したDNA中に存在するかどうかを、該基準配列を検出できるプローブを用いたハイブリダイゼーション法によって調べることによって、検体細菌の分類学的な同定を行なう方法である。

この方法におけるプローブとしては、細菌の染色体からクローン化したDNA断片、細菌の保持しているプラスミドそのもの、合成オリゴヌクレオチド等が用いられる。

具体的には、プローブとして

- 1) クローン化したランダムフラグメントを用いる方法、
- 2) リボゾームRNAを用いる方法及び
- 3) リボゾームRNAの塩基配列から選択した種や属に特徴的な塩基配列を有する合成オリゴヌクレオチドを用いる方法がある。

Gobel, U.; FEMS Microbiol. Lett., 43: 187-194; 1987に報告されている。

しかながらこれらの方法においても、先に述べたハイブリダイゼーションを利用した核酸の各種分析方法における問題点を共通して有している。

本発明は、以上述べたようなハイブリダイゼーション法を利用する従来の各種検出方法における問題点に鑑みなされたものであり、その目的は、簡便かつ正確に実施できるハイブリダイゼーション法を利用した核酸の検出方法を提供することにある。

[課題を解決するための手段]

本発明の核酸の検出方法は、試料核酸とプローブ核酸とを反応させ、得られた反応混合物中への被検出核酸・プローブ核酸ハイブリッドの形成の有無を分析する過程を含む核酸の検出方法において、

- a) 試料核酸とプローブ核酸とを反応させる過程と、

b) 過程 a で得られた反応混合物中に形成されたハイブリッドのみに標識を施す過程と、

c) 過程 b において標識化されたハイブリッドを該標識を利用して検出する過程と

を含むことを特徴とする。

本発明は、ヒト、動物、植物、細菌等の微生物、真菌、原生動物等の生体由来する DNA や RNA、クローン化 DNA、組換え DNA、合成 DNA 等の各種核酸の検出、定量に利用でき、検出対象となる核酸（被検出核酸）の種類は限定されない。

プローブ核酸としては、被検出核酸と効果的にハイブリダイズできる塩基配列を有する核酸であればどのようなものでも利用できるが、合成機で手軽に合成できる比較的短いヌクレオチド鎖長のオリゴヌクレオチドが利用し易い。

プローブ核酸のヌクレオチド鎖長は、被検出核酸のヌクレオチド鎖長の 1/10 以下とするのが好ましい。

なお、本発明においては、プローブ核酸と被検

出核酸との間で、その伸展部分に標識物質を取り込ませる方法による標識化方法で、プローブ核酸をプライマーとして利用する場合、形成されるハイブリッドが、プローブ核酸とハイブリダイズした被検出核酸のヌクレオチド鎖がプライマー端部の伸展の際の鋳型として機能できるように構成、すなわちプローブ核酸の末端伸展方向に被検出核酸のヌクレオチド鎖が一本鎖の状態存在する構成を有している必要がある。

従って、このようなプローブ核酸をプライマーとして利用するこの標識化方法の場合には、プローブ核酸の構成やヌクレオチド長を、形成されるハイブリッドの構造を考慮して決定するのが望ましい。

なお、場合によっては試料核酸をプライマーとして利用するものであっても良い。

試料核酸とプローブ核酸とのハイブリダイゼーションは、常法に従って行なうことができる。

なお、ハイブリッド形成反応の条件は、用いられるプローブ核酸の有するヌクレオチド鎖長や塩

基配列などによって異なるので、ハイブリダイゼーションにおける操作条件は所望とする目的に応じて最適条件を適宜選択すると良い。

このハイブリッド形成反応は、一般的には、ホルムアミド、適当な塩及び Denhardt 溶液を含むハイブリダイゼーション溶液中で、温度をコントロールして行うことができる。

このハイブリッド形成反応には、試料核酸とプローブ核酸とをハイブリダイゼーション溶液中で反応させる方法、担体に固定化されたプローブ核酸にハイブリダイゼーション溶液中で試料核酸を反応させる方法、担体に固定化された試料核酸にハイブリダイゼーション溶液中でプローブ核酸を反応させる方法等が利用できる。

試料核酸やプローブ核酸の固定化には、核酸をニトロセルロース、ナイロン膜、各種ゲル等の担体に、物理的あるいは化学的に結合させる方法が利用できる。

本発明の方法においては、試料核酸とプローブ核酸を反応させ、その結果形成させられたハイブ

リッドに標識が施されるので、プローブ核酸の構成やヌクレオチド長を、形成されたハイブリッドの標識化が容易であるように選択することが望ましい。

例えば、後述するような、ハイブリッドの二本鎖部分の一方のヌクレオチド鎖をプライマーとして利用し、その末端からヌクレオチド鎖を伸展さ

せる方法で、ハイブリッドに標識が施されるので、プローブ核酸の構成やヌクレオチド長を、形成されたハイブリッドの標識化が容易であるように選択することが望ましい。

例えば、後述するような、ハイブリッドの二本鎖部分の一方のヌクレオチド鎖をプライマーとして利用し、その末端からヌクレオチド鎖を伸展させる方法で、ハイブリッドに標識が施されるので、プローブ核酸の構成やヌクレオチド長を、形成されたハイブリッドの標識化が容易であるように選択することが望ましい。

本発明の方法においては、試料核酸とプローブ核酸を反応させ、その結果形成させられたハイブ

リッドに選択的に標識が施される。

この標識化の方法としては、例えばハイブリッドの二本鎖部分を構成する鎖の一方をプライマーとして利用し、その末端を伸展させて一本鎖部分を二本鎖化する際に、その新たに合成される伸展部分に標識物質を取り込ませる方法等が利用できる。

この方法によれば、ハイブリッドを形成していない核酸には、新たな二本鎖部分形成のためのプライマーとして機能する部分及び伸展部分形成用の鋳型となる部分が存在しないので、上記の標識物質を取り込む二本鎖化反応が生じない。

従って、ハイブリッドを形成していない核酸とハイブリッドとの混合物状態で、この標識化反応を行なっても、ハイブリッドのみに選択的に標識を施すことができる。

この標識化には、プライマーを利用して新たな二本鎖部分を合成するための種々の方法が利用できる。

例えば、プライマー端部の伸展に必要な、

ドを適当な溶媒中に溶解あるいは分散した状態で行なうことができる。

なお、標識化の反応終了後に、標識化されたハイブリッドと、ハイブリッドに取り込まれなかった標識物との分離は、例えば以下のような方法により行なうことができる。

(1) 固定化プローブ核酸を用いた場合：

適当な担体に固定化した固定化プローブ核酸に試料核酸を反応させる。この反応でハイブリッドが形成された場合には、ハイブリッドも担体に固定化されている状態となる。その状態で、更に標識化処理を行なった後、適当な条件下、例えば塩濃度や温度を変えて担体を洗浄し、ハイブリッドに取り込まれなかった標識物を洗い出して除去する。

(2) 固定化試料核酸を用いた場合：

適当な担体に固定化した試料核酸にプローブ核酸を反応させる。この反応でハイブリッドが形成された場合には、ハイブリッドも担体に固定化されている状態となる。以下、上記(1)の方法と

dATP、dCTP、dGTP、dTTPなどのヌクレオチドと標識化すべきハイブリッドとをヌクレオチド鎖形成用の酵素の存在下で反応させ、その際に用いるヌクレオチドの1または2以上に標識化ヌクレオチドを用いて、新たに形成されるヌクレオチド鎖に標識を取り込ませる方法等を利用できる。

この標識化ヌクレオチドとしては、一般にプローブの標識に利用されている、例えば放射性同位元素(RI)により標識化されたもの、例えばビオチン、ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体等の蛍光、発光または発色を誘発するのに必要な酵素や化合物などの非放射性標識物質(non RI)で標識化されたものなどが利用できる。

ヌクレオチド鎖形成用の酵素としては、大腸菌DNAポリメラーゼI、DNAポリメラーゼIのクレノー断片、T₄ DNAポリメラーゼ等の各種DNAのポリメラーゼや逆転写酵素などが利用できる。

本発明における標識化は、ハイブリッドが適当な担体に固定化した状態で、あるいはハイブリッド

同様にして担体を洗浄し、ハイブリッドに取り込まれなかった標識物を洗い出して除去する。

(3) 試料核酸とプローブ核酸を固定化しないで反応させた場合：

適当な媒体中でプローブ核酸と試料核酸を反応させる。得られた反応液に、更に標識化処理を行なった後、ハイブリッドとハイブリッドに取り込まれなかった標識物とを適当な分離方法によって分離する。

この分離方法としては、エタノール沈殿法、ゲルろ過カラムによる分離等が利用できる。

なお、プローブ核酸を上述の反応のプライマーとして利用する場合には、プローブ核酸としてハイブリッド形成後にプライマーとして利用し得る構成やヌクレオチド鎖長を有するものを用いるのが望ましい。また、場合によっては、試料核酸をプライマーとして利用しても良い。

なお、通常、同程度の標識量を用いた場合に、一般にRI標識に比べてnon RI標識は低感度であるが、本発明の方法ではnon RI標識を用

いた場合でも高感度な検出が可能となる。

従来の方法では、短いヌクレオチド鎖長のプローブ核酸を標識化して用いる場合が多いが、このような場合には標識取り込み部の量が制限され、標識の取り込み量に限界がある。

これに対して、本発明の方法では、上述の標識化の操作においてプライマーとなる核酸の末端の伸展により新に合成される2本鎖部分の長さが十分に長いものとなるように、プローブ核酸と試料核酸の組合せを考慮して用いることにより、標識化における標識の取り込み量を多くさせることができ、non R I 標識を用いた場合でもその低感度性を多量の取り込み量で補填することができ、高感度な検出が可能となる。

ハイブリッドの標識化が終了したところで、該標識を利用してハイブリッドの検出を行なう。

なお、形成されたハイブリッドの有する標識量を定量的に分析することによって、被検出核酸の定量を行なうことができる。

以上の操作において、プローブ核酸として、複数種のプローブ核酸の予め設定された固定位置から容易に判定できる。

従って、標識化したプローブを、固定化した試料核酸と反応させる従来の方法におけるように、複数種のプローブ核酸のそれぞれを選別できるように、各プローブ核酸で異なる標識を用いる必要がない。

なお、同一操作で複数種のプローブ核酸でのハイブリッド形成反応を同時に効率良く行なわせるには、各プローブ核酸のヌクレオチド鎖長を、複数種のプローブ核酸における個々のハイブリッド形成反応が同一条件化で進行するために必要な長さに調節しておくことが好ましい。

具体的には、例えば個々のハイブリッド形成反応において形成されるハイブリッドの解離温度(T_m :一本鎖化する温度)をそろえておくことと良い。

すなわち、 T_m 値の算出には、用いるハイブリダイゼーション溶液の種類によって種々の数式が用いられている。例えば、0.9M NaCl 中では

複数種の核酸を用いることにより、試料核酸中に複数種の被検出核酸が含まれている場合にそれらを同時に検出することができる。

複数種のプローブを用いる方法の代表例を以下に示す。

a) 固定化プローブを用いる方法:

まず、複数種の被検出核酸のそれぞれに対応した複数種のプローブ核酸を、どの位置にどのプローブ核酸が配置されているかがわかるように所定の配列で固定化し、それを試料核酸と反応させる。

反応終了後、形成されたハイブリットに標識を施すための処理を行ない、該標識を利用してハイブリット形成位置を検出する。陽性を示す位置から対応するプローブ核酸の種類を特定し、その結果から試料核酸中に含まれていた被検出核酸の種類を判定する。

この方法では、プローブ核酸が予め設定された位置で固定されているので、どのプローブ核酸に試料核酸がハイブリダイズしたかが、このプロー

20mer 以下のオリゴヌクレオチドの T_m は、

$$T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$$

(A、T、G、Cはそれぞれアデニン、チミン、グアニン、シトシンの数を表す。)

で示される(統生化学実験講座1、遺伝子研究法II、P236参照)。

そこで、これに従い、それぞれのプローブ核酸の塩基配列をその式に代入して各プローブ核酸での T_m 値がそろるようにそれらの長さを選択すると良い。

複数種のプローブ核酸のヌクレオチド鎖長は、被検出核酸のヌクレオチド鎖長の平均の1/10以下とするのが好ましい。

b) マイクロプレート等の独立した反応領域を有する担体を用いる方法:

まず、マイクロプレート等の独立した反応領域を有する担体の各反応領域に試料核酸を含むハイブリダイゼーション用の溶液を調製する。

次に、複数種のプローブ核酸のそれぞれを単独で反応領域に加え、ハイブリダイゼーションを行

なう。その際、どの反応領域にどのプローブ核酸が加えられたかがわかるようにしておく。

反応終了後、各反応領域内で形成されたハイブリッドの標識化に必要な反応を行なわせてから、該標識を利用してハイブリッド形成を検出し、陽性を示す反応領域から対応するプローブ核酸の種類を特定し、その結果から試料核酸中に含まれていた被検出核酸の種類を判定する。

なお、同一操作で複数種のプローブ核酸でのハイブリッド形成反応を同時に効率良く行なわせるには、各プローブ核酸のヌクレオチド鎖長を、複数種のプローブ核酸における個々のハイブリッド形成反応が同一条件化で進行するために必要な長さに調節しておくことが好ましい。

例えば、上述したようにT₁がそろうように各ヌクレオチド鎖長を選択すると良い。

複数種のプローブ核酸のヌクレオチド鎖長は、被検出核酸のヌクレオチド鎖長の平均の1/10以下とするのが好ましい。

以上の方法a、bを含む複数種のプローブ核酸

遺伝子病等に特有な遺伝子を検出する方法としては、例えば以下の過程を含む方法等を挙げることができる。

①、検査項目である疾病の指標となる遺伝子と関連するプローブ核酸を適当な担体に固定化する過程。

②、過程①で得た固定化プローブと検体染色体DNA(試料核酸)を反応させる過程。

③、過程②を経た担体に、形成されたハイブリッドの標識化に必要な処理を行なう過程。

④、過程③で形成されたハイブリッドを過程②で行なった標識を利用して検出する過程。

上記過程②で使用される核酸プローブとしては、遺伝子病等の遺伝子に特有な塩基配列の認識に必要な塩基配列を有するものが適宜選択されて用いられ、そのヌクレオチド鎖長は特に限定されない。

例えば、一塩基対の置換による点突然変異に基づく疾患を検出する場合には、一塩基の違いを効果的に、かつ感度良く判定する上で、核酸プロー

を利用する場合の本発明の方法においては、標識化したプローブを固定化した試料核酸と反応させる従来の方法におけるように、複数種のプローブ核酸の選別のための各プローブ核酸への異なる標識による標識化を行なう必要がない。

一方、複数種の試料核酸に対して1種のプローブ核酸を用いた複数種の試料核酸の同時検査を行なうこともできる。

例えば、複数種の試料核酸を、どの試料核酸がどの位置にあるかわかるように適当な担体に固定し、1種のプローブ核酸と反応させ、形成されたハイブリッドの標識化及び標識の検出のための処理を行なうことにより、陽性を示す位置に対応する試料に被検出核酸の存在を確認できる。

更に、この方法は、マイクロプレート等の独立した反応領域を形成できる担体で、核酸を固定せずに行なうこともできる。

以上説明した本発明の核酸の検出方法は、遺伝子病、癌、ウイルス感染症に特有な遺伝子の検出に有用である。

ブとしては、100塩基以下、好ましくは29塩基以下、より好ましくは17~20塩基からなるオリゴヌクレオチドが用いられる。

また、点突然変異に対応する置換部位は、プローブ核酸としてのオリゴヌクレオチドの中央に位置するように配置するのが、より正確な判定を行なう上で好ましい。

過程③において、同一担体上に予め決められた配列で複数検査項目に対応した複数種のプローブ核酸を固定しておけば、複数項目にわたった検査を同時に行なうことができる。なお、この方法には、先に述べた複数のプローブ核酸を用いる方法のaの方法における操作が適用できる。

過程④で用いる検体DNAとしては、染色体DNAそのもの、染色体DNAを適当な制限酵素によって適当な長さに切断したもの等が利用できる。

なお、多項目の検査を同時に行なう場合には、制限酵素で適当な長さに切断した断片を利用するのが効率が良い。

またハイブリッド形成反応は、先に述べたような方法によって行なうことができる。

この方法で、点突然変異を検出する場合、一つのヌクレオチドの違いだけでは、プローブと核酸とのミスマッチが発生して、点突然変異に有無の差別化ができない場合がある。

しかしながら、ハイブリッドの T_m は、ミスマッチハイブリッドにおける相補的でない塩基対数、プローブ核酸のG(グアニン)及びC(シトシン)の含量、プローブ核酸のヌクレオチド鎖長、点突然変異の位置、ミスマッチの種類等によって影響されるので、所望の点突然変異の検出を阻害するミスマッチハイブリッドの発生のない温度条件等を、用いるプローブ核酸の構成等に応じて選択することが重要である。

例えば、ミスマッチハイブリッドに含まれる相補的でない塩基対1つあたり T_m は5～10℃降下する。

従って、ハイブリダイゼーションの温度は、所望とするハイブリッドの T_m と形成し得るミスマッ

化せずに反応させても良い。

そのような方法の一例として以下の過程を含む方法等が挙げられる。

- ①、検体核酸とプローブ核酸を適当な媒体中でハイブリダイズさせる過程。
- ②、過程①で得た反応液に形成されたハイブリッドの標識化に必要な処理を行なう過程。
- ③、過程①で形成されたハイブリッドを過程②で行なった標識を利用して検出する過程。

なお、これらの方法におけるハイブリダイゼーション、ハイブリッドの標識化、標識によるハイブリッドの検出等の操作は先に説明した操作によって行なうことができる。

また、先に複数種のプローブ核酸を用いる方法のbの項で説明した操作に従って複数種のプローブ核酸を個々に用い①～③の過程を、複数種のプローブ核酸について同時に行なうことで、複数の検査項目の同時検査が可能である。

一方、マイクロプレート等の独立した反応領域を形成できる担体の反応領域に、複数の検体核酸

チハイブリッドの T_m を考慮して選択する必要がある。

また、同一担体上に複数種のプローブ核酸を固定化して用いる場合には、上述のミスマッチに係る要件に加えて、各プローブ核酸により形成されるハイブリッドの T_m が揃うように、これらのヌクレオチド鎖長等を調節しておくが良い。

過程③における標識化には先に挙げた方法等が利用できる。

過程④は、用いた標識に応じた方法によって行なわれる。

なお、上述の方法ではプローブ核酸を固定化して用いたが、プローブ核酸の代わりに検体核酸を固定化しても良い。

すなわち、複数検体のそれぞれを固定位置がわかるように固定し、これに1種のプローブ核酸を反応させるようにすれば、1つの検査項目について、複数個の検体を同時に検査することができる。

更に、検体核酸とプローブ核酸のいずれも固定

を、どの反応領域に、検体が入っているかがわかるように別々に投入した後、各ウエルに同種のプローブ核酸を加えて、ハイブリダイゼーション、ハイブリッドの標識化、標識の検出のための処理を行なうことにより、陽性を示すウエルに対応する試料核酸が検査項目に対して陽性かどうかを判定できる。

以上の遺伝子病等に特有な遺伝子の検出方法において、細菌やウイルス等の微生物に特有の塩基配列を有する核酸をプローブとして用い、試料として微生物から分離した核酸を用いることによって、微生物の分類学的な同定を行なうことができる。

その際のプローブ核酸としては、細菌の分類の場合には、20mer程度のヌクレオチド鎖長を有するもの、ウイルスの分類の場合には20mer程度のヌクレオチド鎖長を有するものが好適である。

[実施例]

実施例1

DNA合成機(ABI社、381A型)によりプ

ラスミドpUC 19の一部を構成する以下のDNA塩基配列を有する41mer オリゴヌクレオチドを合成した。

5' GATCGCGCCTTCCCAACAGTTGGCGCAGCCTGAATGGCGAATG 3'

合成物の一部を用い、7 M 尿素を含む15% ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりその純度を調べたところ、90% 以上の純度を有していると判定されたので、この合成物は精製せずに以下の操作に直接用いた。

この合成物の50 μ g を含む溶液50 μ l を、混合試薬液 [0.64M カコシル酸カリウム、3.3mM CaCl₂、0.33mM ジチオスレイトールを含む0.12M トリス-OH (pH6.9)] の100 μ l、4.0mM ピオチン化UTP (BR社製) 40 μ l、1.0mM dTTP 1 μ l、水100 μ l 及びTdT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase) 15 μ l (約90単位) と混合し、10分間、30℃で反応させた。なお、反応は、0.2M EDTA 4 μ l の添加によって停止させた。

一本鎖DNAを含む反応生成物20 μ g と、先に調製した固定化プローブ核酸を試験管に入れ、これに10 \times アニリング溶液 [1 \times アニリング溶液: 60mM MgCl₂、60mM β -メルカプトエタノール及び500mM NaClを含む100mM Tris-HCl (pH8.0)] の10 μ l を加え、更に全体が100 μ l となるように蒸留水を加えた。

得られた混合溶液を65℃に10分間にわたって加温してから、その温度を室温まで約1時間かけて徐々に下げた。

次に、得られた反応液に、10 \times アニリング溶液10 μ l、1mM dATP 10 μ l、1mM dCTP 10 μ l 及び1mM dGTP 10 μ l を加えた後、p³²-TTP100 Ciを添加し、全量を蒸留水によって200 μ l として標識化用の溶液を調製した。

この標識化用溶液に、クレノー断片 (TOYOBO社製) の5単位を加え、氷冷下で1時間反応させた。

反応終了後、反応液中から固体相を分離し、これをTE緩衝液で2度洗浄し、シンチレーションカ

反応を停止させた後、フェノール処理、エタノール沈殿を行ない、得られた沈殿物を乾燥後、水100 μ l に溶解させた。

アガロース (ゲル) を臭化シアンで活性化し、それにアビジンを結合させて固定相 (担体) を形成した。

得られた固定相を、先に得た41mer オリゴヌクレオチドを処理して得た沈殿物の水溶液に加え、20分間ゆっくり攪拌しながらこれらを混合した後、かるい条件で遠心処理し、上清を除去し、固定化プローブ核酸を得た。

一方、試料核酸として、プラスミドpBR 322 (試料A)、プラスミドpUC 19 (試料B) 及びプラスミドpBR 322 とプラスミドpUC 19の混合物 (試料C、混合重量比1:1) を用意し、これらの試料を常法によってEcoRI (TOYOBO製) で消化してから、得られた消化物を加熱処理して、二本鎖DNAを一本鎖化し、各試料から得られた3種の一本鎖DNAを含む反応生成物を個々に用いて以下の操作を行なった。

ウンターによってその放射線の計量を行なった。

その結果、試料Bを用いた操作及び試料Cを用いた操作で最終的に得られた固体相において10⁶ cpm 程度 (試料Aを用いた場合の約10⁴ 倍) の放射線が計数され、これら試料B及びC中にpUC 19が存在することが確認された。

実施例 2

DNA合成機 (ABI社、381A型) によりプラスミドpUC 19の一部を構成する以下のDNA塩基配列を有する41mer オリゴヌクレオチド (プローブA) と、プラスミドpBR 322の一部を構成する以下のDNA塩基配列を有する41mer オリゴヌクレオチド (プローブB) を合成した。

プローブ A

5' GATCGCGCCTTCCCAACAGTTGGCGCAGCCTGAATGGCGAATG 3'

プローブ B

5' CGGTTTCAGCCCGACCGCTGGCCCTTATCCGGTAACCTATCGT 3'

これらの合成物の純度を、実施例1と同様の操

作で調べたところ、いずれも95%以上の純度を有していた。これらの合成物は精製せずに以下の操作に直接用いた。

これらの合成物のそれぞれの200ng/ μ l濃度のスポット用溶液を調製し、その2 μ lずつをニトロセルロースフィルター(シュライヒャー&シャネル)にプローブAとBのスポットが第1図に示すように配列されるようにスポットし、乾燥させた後、80℃、2時間の焼付けを行なった。

一方、試料核酸として以下のものを用意した。

試料D:

プラスミドpUC 19と大腸菌JM109株から常法により調製した染色体プラスミドの混合物(混合重量比、1:1)

試料E:

プラスミドpBR 322と大腸菌HU101株から常法により調製した染色体プラスミドの混合物(混合重量比、1:1)

試料F:

た。

具体的には、フィルターを、最終濃度が3 \times SSC/及び1 \times Denhardtとなる溶液の200mlに42℃で30分間浸漬してプレハイブリダイゼーションを行なった後、ポリエチレン製の袋内にフィルターがハイブリダイゼーション用溶液に浸漬されるようにこれらを入れて密封し、これらを42℃で12時間反応させた。

反応終了後、ポリエチレン製袋から取り出したフィルターを2 \times SSC/0.1% SDS 500mlに浸し、室温で25分間洗浄し、続いて0.2 \times SSC/0.1% SDS 500mlで同様に室温で35分間洗浄した。

次に、洗浄後の各フィルターを以下の組成の標識化用の溶液に浸漬した状態で、ポリエチレン製袋内に密封し、37℃、2時間放置して反応させた。

大腸菌HU101株から常法により調製した染色体プラスミド

試料D~Fを個々に用いて以下の操作を行なった。

試料1 μ gを含む溶液2 μ lに、10 \times TA緩衝液2.0 μ l及び水16.0 μ lを混合し、得られた混合液に10単位のHindIII(TOYOBO製)を加え、37℃で2時間放置して、反応させた。

反応終了後、反応液を、95℃、5分間加熱して、二本鎖DNAを一本鎖化した後、100%ホルムアミド9ml、20 \times SSC 5ml、50 \times Denhardt溶液0.4ml、1Mリン酸ナトリウム(pH6.5)0.4ml及び50.0mg/ml濃度の変性サケ精子DNA(Sigmer社製)0.1mlと混合し、ハイブリダイゼーション用の溶液とした。

以上の操作によって、各試料からの3種のハイブリダイゼーション用溶液が得られた。

次に、各ハイブリダイゼーション用溶液に先に容易したプローブ核酸を固定したフィルターをそれぞれ浸漬し、ハイブリダイゼーションを行なっ

標識化用溶液組成:

1mM dATP	20 μ l
1mM dGTP	20 μ l
1mM dCTP	20 μ l
0.4mM ビオチン化UTP	50 μ l
10 \times アニーリング溶液	100 μ l
クレノー断片	10 μ l
蒸留水	残部
計 2ml	

反応終了後、取り出した各フィルターをTE緩衝液で洗浄してから、常法(Bioindustry, Vol. 3, No. 6, 1989, p479-504等参照)に従って、呈色反応を行なった。

その結果、試料Aからのハイブリダイゼーション溶液と反応させたフィルターではプローブAのスポット部分が発色し、また試料Bからのハイブリダイゼーション溶液と反応させたフィルターではプローブBのスポット部分が発色した。これに対し、試料Cからのハイブリダイゼーション溶液と反応させたフィルターではスポット部分における発色は認められなかった。

実施例 3

フェニルアラニン尿症患者の白血球DNAに見られるPAH遺伝子の変異のなかで頻度の高い変異(*部)として以下のものが知られている。

ハプロタイプ 3

正常: 5'TCCATTAACAGTAAGTAATTT3' (プローブ 1)

異常: 5'TCCATTAACAATAAGTAATTT3' (プローブ 2)

ハプロタイプ 2

正常: 5'GACAATACCTGGCCCTTCTC3' (プローブ 3)

異常: 5'GACAATACCTTGGCCCTTCTC3' (プローブ 4)

そこで、これら4種のオリゴヌクレオチドをプローブ核酸として利用するためにDNA合成機(ABI社、381A型)で合成した。

なお、得られた合成物の純度を実施例1と同様の操作で調べたところ、いずれも95%以上の純度を有していた。

これらの合成物を直接使い、実施例2と同様の操作により、ニトロセルロースフィルターに各プローブのスポットを第2図に示す配置で形成し

溶液 0.5ml 及び蒸留水 3.4ml を加えた後、更にクレノー断片16単位を加え、37℃で1時間反応させた。

この反応で、第3図に示すような二本鎖部分を有するハイブリッドが形成されている場合には、その二本鎖部分のプライマーとして機能する片方の鎖の3'末端からDNAが合成され、末端が3'末端下流へ向けて(矢印方向に)進展する。その際に、新しく形成される片側のヌクレオチド鎖内に標識が取り込まれることになる。

次に、未反応のビオチン化UTPを除去するために、フィルターを2×SSCで洗浄した。

洗浄後のフィルターを常法に従った発色反応にかけたところ、プローブ2のスポットが発色したので、この検体提供者はフェニルアラニン尿症の疑いがあると判定された。

実施例 4

任意に選択した数人の検体提供者からの培養羊水細胞を個々に使い、常法に従って、2本鎖DNAを抽出し、Pvu IIで消化した後、100℃、

た。

次に、任意に選択した検体提供者からの培養羊水細胞から、常法に従って、2本鎖DNAを抽出し、Pvu IIで消化した後、100℃、10分間の加熱処理により2本鎖DNAを1本鎖化した。

容器内に、各プローブのスポットを形成したフィルターと、10×アニーリング溶液0.5mlを入れ、更に蒸留水を加えて全体の容量を5mlとし、溶液にフィルターが浸漬されるようにした。

これに、先に得た検体としての1本鎖DNA断片混合物を加え、65℃、10分間放置した。

所定時間経過後、約1時間かけて反応液を徐々に室温まで放冷した。

なお、この反応によってハイブリッドが形成された場合、第3図に示すようなプローブと検体DNAとの部分的二本鎖が形成されていると考えられる。

次に、室温まで放冷された反応液に、1mM dATP 0.2ml、1mM dGTP 0.2ml、1mM dCTP 0.2ml、0.4mM ビオチン化UTP 0.5ml、10×アニーリング

10分間の加熱処理により2本鎖DNAを1本鎖化し、各検体提供者からの1本鎖DNA混合物を得た。

次に、実施例2と同様にして、各DNA混合物(各2μg)をニトロセルロースフィルターに、どのスポットがどの検体提供者からのものであるかがわかるようにスポットした。

更に、容器内に、各検体DNA混合物のスポットを形成したフィルターと、10×アニーリング溶液0.5mlを入れ、更に蒸留水を加えて全体の容量を5mlとし、溶液にフィルターが浸漬されるようにした。

これに、実施例3で得たプローブ1の1μgを添加し、65℃で、10分間放置した。

所定時間経過後、約1時間かけて反応液を徐々に室温まで放冷してから、実施例3と同様の標識化、洗浄、発色のための処理を行なった。

更に以上の操作をプローブ2~4のそれぞれについて行なった。

その結果、プローブ2を用いた場合にフィル

ター上の5番目のスポットが呈色し、このスポットの検体の提供者はフェニルアラニン尿症の疑いがあると判定された。

実施例5

実施例3で合成したプローブ1~4(各約1μgずつ)をどのウエルにどのプローブが含まれるかがわかるようにマイクロプレートに過した。

次に、任意に選択した検体提供者からの培養羊水細胞から、常法に従って、2本鎖DNAを抽出し、Pvu II(TOYOBO社製)で消化した後、100℃、10分間の加熱処理により2本鎖DNAを1本鎖化して、検体1本鎖DNAを含む混合物を得た。

このDNA混合物を、各ウエルに50ngずつ投入した。

更に、各ウエルに、10×アニーリング溶液7μlを加えてから、各ウエル内の溶液量が70μlとなるように蒸留水を加えた。

この状態のマイクロプレートを65℃で10分間放

た後、BCIP溶液(BRL社製)30μl、NBT溶液(BRL社製)44μl及び緩衝液A 10mlの混合溶液を各ウエルに200μl加え、室温で30分間の反応を行なわせてから、プレートリーダーによって発色を判定した。

その結果、プローブ2のウエルに強い発色が認められ、この検体提供者はフェニルアラニン尿症の疑いがあると判定された。

実施例6

DNA合成機(ABI社、381A型)によりプラスミドpUC19の一部を構成する以下のDNA塩基配列を有する4merオリゴヌクレオチドを合成した。

5' GATCGCCCTTCCCAACAGTTGCCGAGCCTGAATGCCGAATG 3'

合成物の一部を用い、7M尿素を含む15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりその純度を調べたところ、90%以上の純度を有していると判定されたので、この合成物は精製せずに以下の操作のプローブ核酸として用いた。

置してから、約1時間かけて徐々に室温まで放冷した。

次に、各ウエルに、1mM dATP 5μl、1mM dGTP 5μl、1mM dCTP 5μl、0.4mM ビオチン化UTP 8μl、10×アニーリング溶液7μl及び蒸留水40μlを加えて混合した後、更にクレノー断片10単位を加え、37℃で1時間反応させ、標識化を行なった。

反応終了後、エタノール350μlを各ウエルに加え、-70℃で1時間冷却した後、各ウエル内から上清を吸引廃棄し、上清とともに未反応のビオチン化UTPを除去した。

次に、マイクロプレートを乾燥させた後、ウシ血清アルブミン(Sigmer社製)によって常法によりブロッキングを行なってから、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ溶液(BRL社製)を各ウエルに加え、37℃で反応させた。

30分間経過したところで、液体を各ウエルから吸引廃棄し、更に0.1M Tris-HCl(pH9.5)-0.1M NaCl-50mM MgCl₂溶液(緩衝液A)で洗浄し

一方、試料核酸として、プラスミドpBR322(試料A)、プラスミドpUC19(試料B)及びプラスミドpBR322とプラスミドpUC19の混合物(試料C、混合重量比1:1)を用意し、これらの試料を常法によってEcoRI(TOYOBO製)で消化してから、得られた消化物を加熱処理して、二本鎖DNAを1本鎖化し、各試料から得られた3種の一本鎖DNAを含む反応生成物を個々に用いて以下の操作を行なった。

一本鎖DNAを含む反応生成物20μgと、先に調製したプローブ核酸20μlを反応チューブに入れ、これに10×アニーリング溶液[1×アニーリング溶液:60mM MgCl₂、60mM β-メルカプトエタノール及び500mM NaClを含む100mM Tris-HCl(pH8.0)]の10μlを加え、更に全体が100μlとなるように蒸留水を加えた。

得られた混合溶液を65℃に10分間にわたって加熱してから、その温度を室温まで約1時間かけて徐々に下げた。

次に、得られた反応液に、10×アニーリング溶

液10 μ l、1mM dATP 10 μ l、1mM dCTP 10 μ l
及び1mM dGTP 10 μ lを加えた後、p³²-TTP100
Ciを添加し、全量を蒸留水によって200 μ lとし
て標識化用の溶液を調製した。

この標識化用溶液に、クレーン断片(TOYO
BO社製)の5単位を加え、氷冷下で1時間反応
させた。

反応終了後、GENECLEAN™(BIO 101社)を用
い、反応液中の未反応のp³²-TTPと形成されたハ
イブリッドを以下のようにして分離した。

GENECLEANのシリカマトリックス(5 μ l)を
反応液200 μ lに加え、よく攪拌し、氷中に10分
間保持した後、5秒間遠心し、上清を除去して、
シリカマトリックス/ハイブリッド結合物のベ
レットを得た。

その際、未反応のp³²-TTPは、上清と共にシリ
カマトリックスに結合しているハイブリッドから
分離された。

GENECLEANの分離液で得られたベレットを3回
洗浄し、これに3 μ lの純水を加え、50℃、2分

表1の割合でI群; NO.1~NO.10のマイクロブ
レートウエルにそれぞれ投入し、またコントロー
ルとしてpBR 322を一本鎖に解離したものを下記
表1の割合でII群; NO.1~NO.10のマイクロブ
レートウエルにそれぞれ投入した(第4図(A)参
照)。

間のインキュベーションを行ない、ベレットからハイ
ブリッドを溶離させ、ハイブリッドを含む上清を
遠心により回収した。

回収した上清をシンチレーションカウンターに
かけ、その放射線の計量を行なった。

その結果、試料Bを用いた操作及び試料Cを用
いた操作で最終的に得られた溶液では10⁷cpm程
度(試料Aを用いた場合の約10³倍)の放射線が
計数され、これら試料B及びC中にpUC 19が存在
することが確認された。

実施例7

以下のpUC 19の一部を構成するオリゴヌクレオ
チドを合成し、そのままプローブとして用いた。



このプローブ(以下プローブAという)をI
群; NO.1~NO.10の計10個、並びにII群;
NO.1~NO.10の計10個のマイクロプレートウ
ェルにそれぞれ1 μ gづつ導入した。

次に試料pUC 19を一本鎖に解離したものを下記

表 1

NO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
DNA量(ng)	100	50	10	5	1	0.5	0.1	0.05	0.01	0.005

更に、各ウエルに、 $10\times$ アニーリング溶液 $7\mu\text{l}$ を加えてから、各ウエル内の溶液量が $70\mu\text{l}$ となるように蒸留水を加えた。

この状態のマイクロプレートに 65°C で10分間放置してから、約1時間かけて徐々に室温まで放冷した。

次に、各ウエルに、 1mM dATP $5\mu\text{l}$ 、 1mM dGTP $5\mu\text{l}$ 、 1mM dCTP $5\mu\text{l}$ 、 0.5mM ビオチン化UTP $8\mu\text{l}$ 、 $10\times$ アニーリング溶液 $7\mu\text{l}$ 及び蒸留水 $40\mu\text{l}$ を加えて混合した後、更にクレノー断片10単位を加え、 37°C で1時間反応させ、標識化を行った。

反応終了後、エタノール $350\mu\text{l}$ を各ウエルに加え、 -70°C で一時間冷却した後、各ウエル内から上清を吸引廃棄し、上清とともに未反応のビオチン化UTP を除去した。

次に、マイクロプレートを乾燥させた後、ウシ血清アルブミン (Sigma社製) によって常法によりブロッキングを行ってから、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ溶液 (BRL社

このプローブ (以下プローブBという) をⅢ群 ; NO.1~NO.10 の計10個、並びにⅣ群 ; NO.1~NO.10 の計10個のマイクロプレートウエルにそれぞれ $1\mu\text{g}$ づつ導入した。

次に試料pUC 19を一本鎖に解離したものを上記実施例7の表1と同様の割合でⅢ群 ; NO.1~NO.10 のマイクロプレートウエルにそれぞれ投入し、またコントロールとして試料pBR 322を一本鎖に解離したものを上記実施例7の表1と同様の割合でⅣ群 ; NO.1~NO.10 のマイクロプレートウエルにそれぞれ投入した (第4図(B)参照)。

更に、各ウエルに、 $10\times$ アニーリング溶液 $7\mu\text{l}$ を加えてから、各ウエル内の溶液量が $70\mu\text{l}$ となるように蒸留水を加えた。

この状態のマイクロプレートに 65°C で10分間放置してから、約1時間かけて徐々に室温まで放冷した。

反応終了後、エタノール $350\mu\text{l}$ を各ウエルに加え、 -70°C で一時間冷却した後、各ウエル内から上清を吸引廃棄し、上清とともに未反応のプ

ローブを各ウエルに加え、 37°C で反応させた。

30分間経過したところで、液体を各ウエルから吸引廃棄し、更に 0.1M Tris-HCl ($\text{pH}9.5$)- 0.1M NaCl - 50mM MgCl₂ 溶液 (緩衝液A) で洗浄した後、BCIP溶液 (BRL社製) $30\mu\text{l}$ 、NBT溶液 (BRL社製) $44\mu\text{l}$ 及び緩衝液A $10\mu\text{l}$ の混合溶液を各ウエルに $200\mu\text{l}$ 加え、室温で30分間の反応を行なわせてから、プレートリーダーによって発色を判定した。

その結果、Ⅰの群ではNO.7の 0.1ng まで発色した。Ⅱの群のコントロールは発色をみなかった。比較例1

以下に示すpUC 19の一部を構成する2本鎖DNAを合成し、その5'末端のリン酸を除去し、そのかわりにビオチン化dUTPをT4ファージ由来ポリヌクレオキナーゼで導入し、標識化したものを一本鎖に解離しプローブとして用いて従来法による検出を行なった。

```

5'
ATCGCCCTTCCCAACAGTTGGCCAGCCTGAATGGCGAAT
TAGCGGGAAGGGTTGTCAAACGGCGTGGACTTACCGCTTA
3'

```

ローブを除去した。

次に、マイクロプレートを乾燥させた後、ウシ血清アルブミン (Sigma社製) によって常法によりブロッキングを行ってから、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ溶液 (BRL社製) を各ウエルに加え、 37°C で反応させた。

30分間経過したところで、液体を各ウエルから吸引廃棄し、更に 0.1M Tris-HCl ($\text{pH}9.5$)- 0.1M NaCl - 50mM MgCl₂ 溶液 (緩衝液A) で洗浄した後、BCIP溶液 (BRL社製) $30\mu\text{l}$ 、NBT溶液 (BRL社製) $44\mu\text{l}$ 及び緩衝液A $10\mu\text{l}$ の混合溶液を各ウエルに $200\mu\text{l}$ 加え、室温で30分間の反応を行なわせてから、プレートリーダーによって発色を判定した。

その結果、Ⅲの群では 5ng まで発色した。Ⅳの群のコントロールは発色をみなかった。

実施例7及び比較例1より本発明の方法によれば従来例より50倍程度検出感度がよくなることが確認できた。これはアニーリング後の伸展反応でビオチン化dUTPを50倍程度多くとりこむためと考えら

れる。

〔発明の効果〕

本発明においては、標識化したプローブ核酸を用いないので、プローブ核酸に標識化のための要件が要求されない。その結果、入手が容易であり、かつ高感度な検出が期待できるヌクレオチド鎖長の短いものをプローブ核酸として利用でき、簡便な操作で感度の良い検出が行なえる。

また、本発明においては、形成されたハイブリッドに標識が施されるので、非放射性標識を用いた場合でも効率良い標識化が可能となり、標識化及び検出操作がより安全で簡便なものとなる。

しかも、プローブ核酸に標識化を施す従来の方法では、全ての、すなわちハイブリッドの形成に関与しないプローブ核酸にも標識が施されているのに対して、本発明の方法では、形成されたハイブリッドだけが標識化されるので、標識物質の節約ができる。

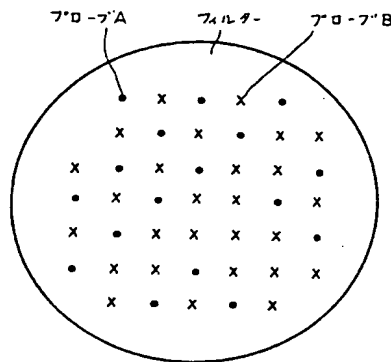
更に、複数種のプローブ核酸を用いて同時に複

数の核酸の検出を行なう場合、プローブ核酸を核酸を標識化する従来の方法では、複数のプローブ核酸の差別化を複数の異なる標識を用いることで行なうという煩雑な操作が必要とされたが、本発明によれば形成されたハイブリッドの標識化を1種の標識で行なえば良く、標識化操作が簡易化され、複数の核酸の検出を極めて簡便に効率良く行なうことができる。

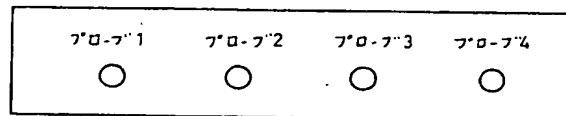
4. 図面の簡単な説明

第1図は実施例2におけるプローブ核酸のスポットの配列を示す図、第2図は実施例3におけるプローブ核酸のスポットの配列を示す図、第3図は被検出核酸・プローブ核酸ハイブリッドの構成を模式的に示した図、第4図は(A)、(B)は実施例7及び比較例1を説明するための図である。

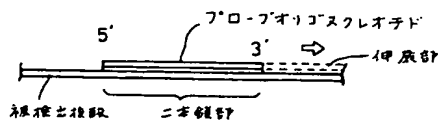
特許出願人 キヤノン株式会社
代理人 弁理士 若林 忠



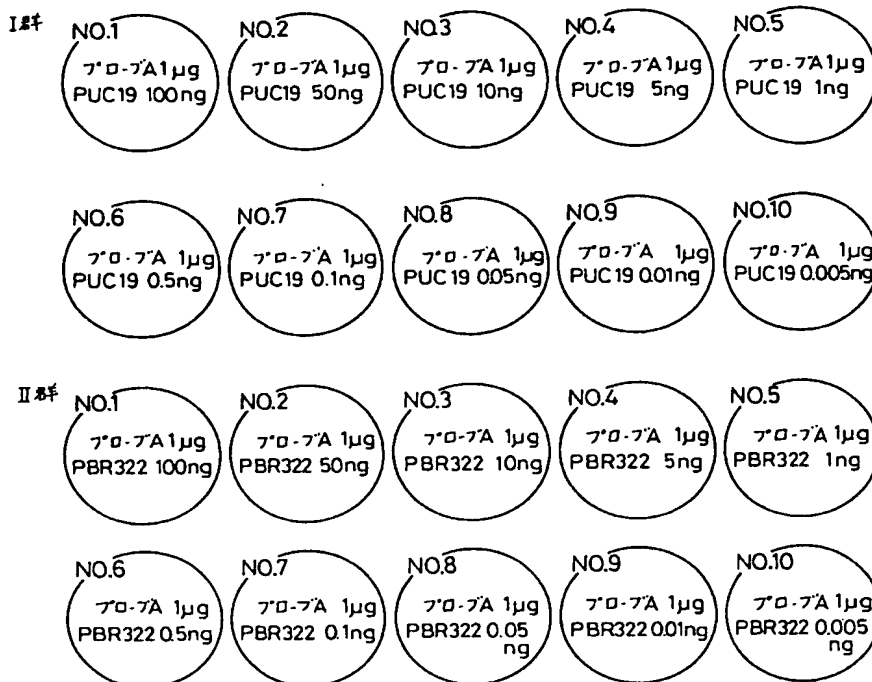
第 1 図



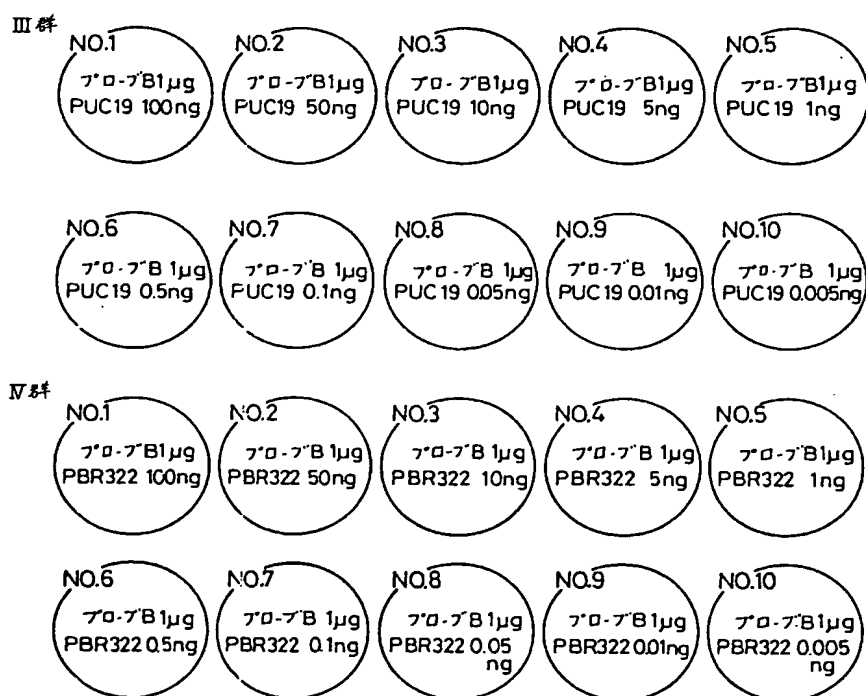
第 2 図



第 3 図



(A)
第 4 図



(B)
第 4 図

手続補正書(自発)

平成2年7月5日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示 平成1年 特許願 第303182号

2. 発明の名称 核酸の検出方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人
(100) キヤノン株式会社

4. 代理人

住所 東京都港区赤坂1丁目9番20号
第16興和ビル8階
氏名 弁理士(7021) 若林 忠
電話(585)1882



5. 補正の内容

- (1) 明細書第40頁第11行にある「Dnhardt」を、「Denhardt」に訂正する。
- (2) 明細書第47頁第7行にある「適し」を、「適用し」に訂正する。
- (3) 明細書第48頁下から5行及び第55頁下から第1行にある「アルカリホスファターゼ」を、「アルカリホスファターゼ」に訂正する。
- (4) 明細書第56頁第14行～第16行にある「その5'末端・・・導入し、」を、「その3'末端にピチオン化dUTPをT₄ファージ由来ポリメラーゼで導入し、」に訂正する。

5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

方式 特許

